2x SYBR Green qPCR Master Mix

产品组成

产品	Cat #: B21202	Cat #: B21203	Cat #: B21204
2x SYBR Green qPCR Master Mix[a]	5 ml (200 rxn)	25 ml (1000 rxn)	25 ml x 2 (2000 rxn)
50× ROX Reference Dye 1[b]	200 µl	1000 µl	2000 µl
50× ROX Reference Dye 2[b]	200 µl	1000 µl	2000 µl

a. 包含热启动 DNA 聚合酶，dNTPs，Mg^{2+}以及SYBR Green I dye。

b. 用于校正不同孔荧光信号的差异。

储存条件

所有试剂储存于-20℃。

注意：

对应不同的Real-time PCR仪器选择恰当的ROX：

不使用ROX Reference Dye	Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycleriQ™, iQ™5, MyiQ™,Opticon®, Opticon 2, Chromo4™; MiniOpticon™, Cepheid SmartCycler®; Eppendorf Mastercycler® eprealplex, realplex 2s; Illumina Eco qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000; Roche Applied Science LightCycler™ 480; Thermo Scientific PikoReal Cycler.
使用ROX Reference Dye 1（高浓度）	Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne™, StepOne Plus™.
使用ROX Reference Dye 2（低浓度）	Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViiA™7; Stratagene MX4000™, MX3005P™, MX3000P™.

使用方法：

1. 建议的模板量10-100ng（基因组DNA）或1-10ng（cDNA模板）。以下上样表格以20µl和50µl为例：

成分	每个反应用量（µl）	每个反应用量（µl）	终浓度
2x SYBR Green qPCR Master Mix	25	10	1x
模板	可变	可变	1-100ng
上游引物（5µM）	0.5 - 9	0.2 - 3.6	50-00 nM
下游引物（5µM）	0.5 - 9	0.2 - 3.6	50-900 nM
ROX Reference Dye	1	0.4	1x
去离子水	加至50	加至20	-
总反应体系[c]	50	20	-

c该产品也可以用于10µl的反应体系。

2. 标准的两步法扩增程序：

Step	1	2		3		
	Hot-Start DNA Polymerase Activation	PCR		Melt Curve		
	HOLD	CYCLE (40 cycles)		CYCLE (1 cycle)		
		Denatur	Anneal / Extend			
Temp.	95.0 ℃	95.0 ℃	60.0 ℃	95.0 ℃	60.0 ℃	95.0 ℃
Time	5 - 10 mins	15 secs	30 - 60 secs	15 secs	60 secs	15 secs
Volume	50 µL			50 µL		

3. 快速两步法扩增程序：

Step	1	2		3		
	Hot-Start DNA Polymerase Activation	PCR		Melt Curve		
	HOLD	CYCLE (40 cycles)		CYCLE (1 cycle)		
		Denatur	Anneal / Extend			
Temp.	95.0 ℃	95.0 ℃	60.0 ℃	95.0 ℃	60.0 ℃	95.0 ℃
Time	5 - 10 mins	3 secs	15 - 30 secs	15 secs	60 secs	15 secs
Volume	50 µL			50 µL		

注意：95℃加热5-10min激活热启动DNA聚合酶，如果扩增序列富含GC，需要延长至10min；该程序设置也适用于10µl及20µl体系。

订购 & 咨询

Tel: 400-668-6834 Fax: 021-68591981 Email: order@biotool.cn

常见问题：

问题	可能的原因	建议改进
阴性对照中出现明显的扩增结果	所使用的试剂或去离子水被污染	更换新的试剂及去离子水并保证在洁净的实验台上进行实验
	引物二聚体	35个循环之后阴性对照出现明显扩增是正常的，应该结合溶解曲线进行分析
Ct值明显过高或过低	低扩增效率	优化反应体系，尝试三步法或重新设计引物
	模板浓度太低	增大模板浓度
	模板发生降解	制备新鲜的模板
	扩增片段太长	扩增片段的长度建议为100-200bp
	反应体系中存在PCR抑制物	抑制物往往由于模板的加入而引入，可以稀释模板或者重新制备模板
扩增曲线形状异常	扩增曲线形状异常	信号较弱时系统的校正会导致此结果，可以通过提高模板浓度改进
	断裂或下降的扩增曲线	模板浓度太高，基线的终点值高于Ct值，可以减小基线的终点值（Ct值-4）并且重新分析数据
	扩增曲线突然下降	反应体系中存在气泡并且在温度升高的时候突然破掉，设备会探测到突然的荧光值下降，可以离心并检查是否存在气泡
无扩增曲线	循环数不足	循环数一般设为40（过多的循环数导致较高背景从而减少数据的可靠性）
	循环程序中不存在信号收集程序	两步法中信号收集是设定在退火和延伸步骤；三步法中信号收集应该设定在72℃延伸步骤
	引物降解	长期储存后应该通过PAGE胶确定引物的完整性
	模板浓度太低	降低稀释比（对于未知表达情况的目的基因，首次检测采用模板原液）
	模板降解	制备新鲜模板